

**PARTICULATE-LABELLING-BOND TESTING METHOD FOR ANALYSIS
PERFORMED BY MICROWAVE SPECTROSCOPY****Publication number:** JP5188013**Publication date:** 1993-07-27**Inventor:** ROBAATO TEII BATSUKURAA; POORU OO
BOGERUHATSUTO**Applicant:** MILES INC**Classification:****- international:** G01N22/00; G01N33/53; G01N33/543; G01N33/553;
G01N22/00; G01N33/53; G01N33/543; G01N33/551;
(IPC1-7): G01N22/00; G01N33/53; G01N33/543**- european:** G01N33/543D; G01N33/543K2; G01N33/553**Application number:** JP19920173637 19920609**Priority number(s):** US19910713432 19910610**Also published as:**

EP0519250 (A2)

EP0519250 (A3)

Report a data error here**Abstract of JP5188013**

PURPOSE: To improve the economy by short verification and reduction in size of a detecting system with high sensitivity by measuring the change of dielectric properties of a test mixture in a microwave region.

CONSTITUTION: Liquid-like test mixture containing fine particles covered with ligand, its coupling analog edge or bond partner and test specimen is formed. When the particles are covered with the ligand or its coupling analog edge, the mixture is formed to further include bond partner of ligand diffusion type (the covered particles have significantly different effective relative permittivity from the relative permittivity of the mixture in the state that no ligand is in the specimen). The change of the relative permittivity of the mixture in the microwave region as the quantity of the ligand in the mixture or the function of the presence is measured.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-188013

(43) 公開日 平成5年(1993)7月27日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 22/00	Y	7172-2 J		
// G 0 1 N 33/53	J	8310-2 J		
	B	8310-2 J		
33/543	F	7906-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数21(全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平4-173637	(71) 出願人	391007079 マイルス・インコーポレーテッド MILES INCORPORATED アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、 エルクハート、ミルトル・ストリート 1127
(22) 出願日	平成4年(1992)6月9日	(72) 発明者	ロバート・ティアー・バックラー アメリカ合衆国、ミシガン州、49112、エ ドワーズバーグ、メイ・ストリート 23348
(31) 優先権主張番号	7 1 3 4 3 2	(74) 代理人	弁理士 津国 肇 (外1名)
(32) 優先日	1991年6月10日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ波分光学により分析される微粒子標識結合試験法

(57) 【要約】

【構成】 試験試料中にリガンドが無い場合の試験混合物の比誘電率とは有意に異なる有効比誘電率を有する微粒子が、試験試料中のリガンドの存在又は量の関数又は逆関数として凝集する液状試験混合物を形成する工程、及びマイクロ波領域内で、該試験混合物の誘電特性の変化を測定する工程を含む、試験試料中のリガンドを測定する方法。

【効果】 感度が高く、検定時間が短く、さらに検出システムの小型化による多大な経済性と使用上の便利さを提供する。また一般的有機物質の干渉を受けない。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 試験試料中にリガンドが無い場合の試験混合物の比誘電率とは有意に異なる有効比誘電率を有する微粒子が、試験試料中のリガンドの存在又は量の関数又は逆関数として凝集する液状試験混合物を形成する工程、及び(b) マイクロ波領域内で、該試験混合物の誘電特性の変化を測定する工程、を含むことを特徴とする試験試料中のリガンドを測定する方法。

【請求項2】 微粒子を、前記リガンド又はその結合類縁体又は結合パートナー(結合相手又は結合相手)で被覆する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記凝集が、溶液又は懸濁液の中で生起する、請求項2記載の方法。

【請求項4】 試験混合物の比誘電率をマイクロ波共振分光学を用いて測定する、請求項1記載の方法。

【請求項5】 試験混合物の比誘電率をマイクロ波ストリップライン共振装置を用いて測定する、請求項4記載の方法。

【請求項6】 微粒子が約20nmから約80nmまでの平均直径を有する、請求項1記載の方法。

【請求項7】 微粒子が金属ゾルである、請求項5記載の方法。

【請求項8】 前記金属ゾルが金ゾルである、請求項6記載の方法。

【請求項9】 前記リガンドが、抗原又はハプテン；オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又はホルモン、代謝産物もしくは薬剤であり、前記結合パートナーが、それぞれ抗体又はその断片；相補オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又は受容体である、請求項1記載の方法。

【請求項10】 前記リガンドが抗原又はハプテンであり、前記結合パートナーが抗体又はその断片である、請求項1記載の方法。

【請求項11】 (a) リガンド又はその結合類縁体又は結合パートナーで被覆され、リガンドがない場合の試験混合物の比誘電率とは有意に異なる有効比誘電率を有する微粒子と試料を含む液状試験混合物を形成し、この微粒子が前記リガンド又はその結合類縁体で被覆されている場合には液状混合物を、拡散可能な形のリガンドの結合パートナーをさらに含むように形成する工程、及び(b) 試験混合物内のリガンドの量又は存在の関数として、マイクロ波領域内の試験混合物の比誘電率の変化を測定する工程、を含むことを特徴とする試験試料中のリガンドを測定する方法。

【請求項12】 試験混合物の比誘電率を、マイクロ波共振分光学を用いて測定する、請求項11記載の方法。

【請求項13】 試験混合物の比誘電率を、マイクロ波ストリップライン共振装置を用いて測定する、請求項12記載の方法。

【請求項14】 微粒子が約20nmから約80nmまでの

平均直径を有する、請求項11記載の方法。

【請求項15】 微粒子が金属ゾルである、請求項11記載の方法。

【請求項16】 前記金属ゾルが金ゾルである、請求項15記載の方法。

【請求項17】 微粒子を、前記リガンドの結合パートナーで被覆する、請求項11記載の方法。

【請求項18】 試験混合物が、さらに前記リガンド又はその結合類縁体の拡散性多価形を含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】 微粒子を前記リガンド又はその結合類縁体で被覆し、試験混合物がさらに、拡散可能な形の前記結合パートナーを含む、請求項11記載の方法。

【請求項20】 前記リガンドが、抗原又はハプテン；オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又はホルモン、代謝産物もしくは薬剤であり、前記結合パートナーが、それぞれ抗体又はその断片；相補オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又は受容体である、請求項11記載の方法。

【請求項21】 前記リガンドが抗原又はハプテンであり、前記結合パートナーが抗体又はその断片である、請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、電子的手段により試験応答を測定する、試料中のリガンドの測定方法に関する。特に、当該方法は、試薬をコーティングした微粒子が関与し、該微粒子の凝集が試験混合物の誘電特性に及ぼす効果を測定するような結合試験法を用いた、リガンドの測定に関する。

【0002】

【従来の技術】結合試験法は一般に当該技術分野において、結合パートナー(結合相手又は結合相手)との結合により問題の物質(リガンド)を測定することが関与するものとして理解されている。一般に用いられる結合試験法としては、免疫試験及び核酸ハイブリダイゼーション試験などが含まれる。このような試験は、ハプテン及び抗原と抗体との間又はオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの相補鎖の間の、きわめて特異的な感受性結合相互作用に基づくものである。このような試験は、特に医学診断の分野において非常に強力な分析手段であることが立証されている。感度及び結合試験の利用の容易さといったような分析性能を改善する必要性は常に存在している。標準的な商業的試験には、数量化のために分光光度計又はシンチレーションカウンターを必要とする、光学又は放射信号の生成が関与する。このようなアプローチには、明らかな制限及び欠点がある。放射的方法では、ユーザーは使用中の露出及び廃棄物処分といった両方の面で有害な放射能を取り扱わなくてはならず、また計測器はかなり高価で大型のものである。分光光度

計による方法は、その感度において制限されており、例えば尿、血清又は血漿などのほとんどの対象試験試料中に存在するタンパク質及び細胞碎片といった有機物質からのさまざまな干渉を受ける。

【0003】これらの及びその他の制限の結果として、数多くの代替案が研究されてきた。小型化及び分析性能の改善の可能性のため、電気化学的又は電子的手段によって試験応答が測定される結合試験法を設計し、開発する試みが数多く行われてきた。しかしながら、現在のところ、このようなアプローチの商業的成功は限られたものでしかない。

【0004】米国特許第4,219,335号は、微粒子試薬及び電気リアクタンスに対する効果、好ましくは表面における磁場に対する効果の測定を用いた結合試験法に関するものである。米国特許第4,794,089号は、微粒子が支持する試薬と電極表面に被覆された結合パートナーの間の特異的結合相互作用の効果を、電気伝導率の測定によって検出するための方法について記述している。ドイツのOLS 3802150号は、所定の特性を有する微粒子を含む材料の内含により、液体と

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、(a) 試験試料中にリガンドが無い場合の試験混合物の比誘電率とは有意に異なる有効比誘電率を有する微粒子が、この試料中のリガンドの存在又は量の関数又は逆関数として凝集する液状試験混合物を形成する工程、(b) マイクロ波領域内で試験混合物の誘電特性の変化を測定する工程、を含む、試験試料中のリガンドを測定する方法を提供する。

【0006】微粒子は好ましくは約20nmと80nmの間の平均直径を有し、金ゾルといった金属ゾルから成り、通常リガンド又はその結合類縁体又は結合パートナーで被覆されている。

【0007】好ましくは、試験混合物の比誘電率はマイクロ波共振分光法を用いて、最も好ましくはマイクロ波ストリップライン共振装置を用いて測定される。

【0008】一般に、微粒子の凝集は液体溶液又は懸濁液の中又は固体基板の表面で起こりうる。凝集が溶液又は懸濁液中で起こる場合、この方法には好ましくは、

(a) 前記リガンド又はその結合類縁体又は結合パートナーで被覆された微粒子及び前記試験試料を含む液状試験混合物を形成し、この微粒子が前記リガンド又はその結合類縁体で被覆されている場合には、液状混合物をリ

ガンドの拡散性の形の結合パートナーをさらに含むように形成させる工程（なおここで、被覆された微粒子は、試験試料中にリガンドが無い状態での試験混合物の比誘電率とは有意に異なる有効比誘電率を有する）及び
(b) 試験混合物中のリガンドの量又は存在の関数としての、マイクロ波領域内の試験混合物の比誘電率の変化を測定する工程、が含まれる。

【0009】固体状態の検出装置が用いられる場合、この方法には好ましくは、(a) 前記リガンド又はその結合類縁体又は結合パートナーで被覆された微粒子と前記試験試料を含む液状試験混合物を形成する工程（なお、この試験混合物は、前記リガンドの結合パートナーが結合している固体基板と接触状態にあり、被覆された微粒子は試験試料中にリガンドが無い状態での試験混合物の比誘電率とは有意に異なる有効比誘電率を有する）及び
(b) マイクロ波共振分光法を用いて試験混合物内のリガンドの量又は存在の一関数として、前記固体基板の表面でのマイクロ波領域内の試験混合物の比誘電率の変化を測定する工程、が含まれる。固体基板はマイクロ波ストリップライン要素を含む。場合により、液状試験混合物を測定工程の前に固体基板との接触状態から除去し、好ましくは、基板から試験混合物を除去した後、基板を洗浄する。

【0010】当該方法は、様々なリガンドを測定するため、広範な結合試験法、特に免疫試験及び核酸ハイブリダイゼーション試験に応用できる。このようなりガンド分析物としては、中でも抗原又はハプテン；オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又はホルモン、代謝産物もしくは薬剤が考えられ、結合パートナーはそれぞれ抗体又はその断片；相補オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又は受容体である。

【0011】本発明ではいくつかの主要な利点が明白である。感度—理論上の計算によると、マイクロ波共振分光法による微粒子凝集の検出は、従来の光学的分光法で達成できるよりも数倍感度が高いことがわかっている。小型化—微粒子を検出するためのマイクロ波共振器回路を1平方インチ未満、厚さ1000分の数インチのプリント回路サイズまで縮小することができる。このような回路の検知部域を網羅するには、わずか数マイクロリットルの液状試料又は混合物しか必要でない。このような検出システムの小型化は、多大な経済性と使用上の利便性を提供する。さらに、検出表面積に対する試料体積の有利な比率は、急速な試験速度と短い試験時間の実現を可能にする。干渉の削除—光学方法に干渉する一般的有機物質は、スペクトルのマイクロ波領域において透過性を持つ。血液試料の溶血反応からといった細胞碎片、タンパク質、有色物質は、微粒子凝集の検出とは干渉しない。精度—試験装置の構成は、毛細管要素として知られている要素のような、液体試料又は混合物を正確な量だけ送り出すための手段と適合する。

【0012】当該方法においては、リガンド又は結合パートナーで被覆された微粒子は、時間の関数としてこのような粒子の凝集物を形成することにより、試験媒質中のリガンドについての情報を提供するのに使用される。凝集物の絶対誘電率は、外部的に加わった電界の双極子相互作用及び多重極ひずみを誘発する粒子相互の近位性のため、均質溶液（分散）のものと異なっている。

【0013】微粒子が小さなサイズの粒子を誘導していると考えられる場合、そのサイズにより左右されるその有限導電率の値を考慮に入れなくてはならない。既知のように、金属粒子の導電率は、良導体から絶縁体までその直径の三乗の8倍に比例して減少する。この有限かつサイズ依存性の導電率の効果は、入射電磁エネルギーの損失のためのメカニズムを提供することにある。最大の損失が起こる振動数は、粒子の導電率に正比例し、その絶対誘電率を通しての粒子密度及び媒質の絶対誘電率に反比例する。

【0014】当該粒度について40nmという値を、標準微粒子（例えば金ゾル）の絶対誘電率として1.5、媒質について80という値を選択することにより、凝集による振動数の最大の変化は1ギガヘルツ（GHz）であることがわかる。試験媒質の絶対誘電率の時間依存性の変化を測定するように、マイクロ波共振回路が設計されている。

【0015】この供試体の絶対誘電率の測定は、これに関する諸文献に詳述されている数多くの方法で達成できる。小さな変化に対する感度が高く、選択された振動数範囲内で容易に計装できることから、マイクロ波ストリップライン回路を使用すると有利である。

【0016】最も感度が高く、材料使用量の最も少ない絶対誘電率の測定は、空洞共振測定法であろう。この振動数では、空洞はかさ高く不便でありうることから、電磁波を導く導体パターンが誘電性基板材料上に被着させられ、かくして供試体が回路の重要な領域内に自由に入りできるようにしているストリップライン技術の方が好まれる。共振回路は、供試体が上に沈着される導体の間の小さな間隙絶縁領域を含む誘電性基板上に焼成された銀ペーストからできていてよい。この領域のまわりのエポキシの壁が、測定中、試料を所定の位置に保持している。

【0017】好ましい一実施態様において、この共振回路は、S-パラメーター試験セットが備わったHPネットワーク分析器上で測定される。回路の共振振動数及びQは、供試体が適用された時点で、試験の初めに測定される。次に試験は周期的に繰り返され、時間の関数としての変化が記録される。回路のタイプ及び供試体の位置に応じて、1つの信号が観察され、ここで試料中の絶対誘電率の変化は回路内の共振振動数及びQの変化に関係づけられている。試料は、凝集する粒子クラスターの平均直径変化に対し較正された共振回路の振動数変化及び

時間の関数として、光散乱装置といった基準方法によって測定されうる。

【0018】クラスター自体上の粒子の凝集によるクラスターの形成は、物理、化学、生物学、医学及び工学における実的に重要な数多くの現象における主要なプロセスである。このようなシステムの動力学を記述する上で広く用いられている方法は、クラスターサイズ分布関数の決定である。この数量は特定の質量のクラスターの数の時間依存性を描き、光散乱プロセスの知識から誘導した方法により、実験的に測定可能である。

【0019】テストすべき物質を、検出されうるクラスターの形成のために試験材料と反応させなくてはならない場合、誤った信号を生成する可能性のあるその他の干渉物質を考慮に入れなくてはならない。この試験物質が、全血又は血清の場合そうであるかもしれないように細胞物質、大型タンパク質又はその他の巨大分子を含んでいる場合、これらの光散乱方法は、クラスターサイズ決定のための検出方法としてのその応用において、大幅に制限される。凝集に関係づけられる試験供試体内で測定されうる物理的数量は、電気的分極率である。唯一の必要条件是、反応種がそれ自体その電気的特性により回りの媒質と区別されることである。

【0020】本発明において監視される物理的数量は、試験材料の分極率である。人工誘電体の開発において知られてきたように、材料の誘電特性は、さまざまな密度で支持媒質内により小さな粒子又は物体を含み入れることにより激烈に変化しうる。[Brown, J. 及び Jackson, W., 「The properties of artificial dielectrics at centimetre wavelengths」、IEEE 議事録, 102 pt III, p.11 及び El-Kharadly, M.M.Z., 及び Jackson, W., 「The properties of artificial dielectrics comprising arrays of conducting elements」、IEEE 議事録, 1953年 100, pt III, P199]。

【0021】本発明において、我々は再び人工誘電体を作り出し、時間の関数として化学反応を監視している。クラスター形成の間、材料の局所的密度ひいては材料の分極率が変化する。

【0022】極めて希薄な溶液についてのみ、その他の要素の存在する中で各個別要素に対し作用する電界が、外部的に適用された電界と等しくとどまると仮定することが許される。粒子密度が増大すると、双極子間の相互作用を考慮に入れなくてはならない。第1の補正は、適用された電界と同じ方向に作用する、双極子相互作用電界により表現できる。アレイの要素が増々近くに来て近接するにつれて、これらを単一の双極子と考えることが増々不適切になっていく。結果として生じる電荷分布のひずみは、各粒子を、双極子電界に比べて距離と共にはるかに急速に減少する電界をもたらすより上位の多重極と結びつけることによって、許容することができる。

【0023】分析的に解決可能な例として、間隔aの格

子の形で配置された直径 d の球（金属で完全に導電性をもつ）の立方体アレイを考えることができる。球が体積全体にわたり均等に配置され分布されている場合、直径対間隔の比は、例えば0.1と仮定することができる。双極子の相互作用を無視した比誘電率に対する適切な補正は、比 (d/a) の3乗に比例して、非常に小さいものとなるだろう。

【0024】全く反対のケースでは、溶液の体積全体にわたり均質に分布されているのではなく、球は、同数を含むもののはるかに小さな体積を占める密に詰め込まれた立方体アレイを形成することができる；この場合、より高位の多重極を補正しなくてはならない。間隔のこのセクションに対する補正率は、直径に等しい。

【0025】従って、1辺10ミクロンの寸法の立方体は、全体の密度を粒子 10^{12} 個/mLとしたとき1000個の粒子を含んでいる。粒子直径が100nmで、粒子間距離が1ミクロン又は $10 \times$ 粒子直径であるならば、比率 $d/a=0.1$ である。これは、体積内の粒子の比較的均等な分布について言えることである。

【0026】極端な群がりのケースは、同じ寸法の立方体の1つのコーナーへの1000個すべての粒子の凝集によってシミュレーションできる。全濃度は上述のものと同じにとどまるが、凝集物の中で粒子間寸法はこのとき直径に等しく $d/a=1.0$ である。これらの条件下では、新しい絶対誘電率は上述の値の6倍により与えられる。補正值は、粒子の変化した分極率から誘導される。合計体積の1つのコーナー内での立方体アレイへのこのタイプの凝集が極端なケースであり、関与する原理を例示するためにのみ役立つものであるということを覚えておかななくてはならない。

【0027】クラスターの成長の動力学は、すでに記述されてきたきわめて特定の法則に従う。[Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R., Meakin P., 「Universality in colloid aggregation」, Nature, 339: 360-362 (1989年)]。結果として得られるクラスター密度ひいては d/a 値は1.0未満となり、その溶液中で反応系に特有なパラメーターにより左右される。不可逆的な凝集の、2つの全く異なる制限の状態を識別することができた。拡散制限凝集は、粒子間の斥力が無視できるほどであり、そのため凝集速度がクラスターが拡散により互いと遭遇するのにかかる時間によってのみ制限される場合に起こる。反応制限凝集は、粒子間の斥力がなおも大きい打破できないほどではなく、そのため凝集速度が熱による活性化によりこの斥力バリアを2つのクラスターが克服するのにかかる時間によって制限される場合に起こる。

【0028】クラスターが、生物学的分子の場合にそうでありうるように、凝集中に多大な再構成を受ける場合、フラクタル次元は、しっかり組立てられたユニットの場合に比べはるかに高いものでありうる。本発明の場

合、凝集の速度論は、平均クラスター直径対時間の2重対数プロット上で1本の直線という結果をもたらす法則に従う。

【0029】本発明に基づく方法は、さまざまな試験試料中のさまざまな分析対象物質の定性的又は定量的測定に使用することができる。基本的にいかなる形の材料でも、それが液体であるか、抽出、溶解、懸濁などによって液体の形にすることができるか、或いは又液状試験混合物に付加できるものであることを条件として、試験試料として利用できる。通常、試験試料は本来液体であり、往々にして血液、血清、血漿、尿、脳液、脳せき髄液、だ液、スワブ抽出物などの生物学的流体である。産業廃液、食物及び土壌抽出物又は河水又は湖水といった環境から採取した試料などのような非生物学的供試体も同様に処理できる。液状試験混合物は同様に、希釈、ろ過、濃縮、化学処理などの試料前処理の結果として得ることもできる。これらは全て、当該技術分野の常識の問題である。

【0030】当該方法は、さまざまな物質（分析物）の測定に応用できる。このような物質をここでは、それらが結合パートナーとの特異的結合相互作用を有することに基づいてリガンドと呼ぶ。このリガンドは、通常、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、糖タンパク質、ステロイド、核酸又は、結合パートナーが存在するか又は合成その他の方法で生成できるようなその他の有機単位である。機能的な面から言うと、リガンド及びその結合パートナーは通常、抗原、ハプテン、抗体、相補オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、ホルモン、ビタミン、代謝産物、薬剤及び受容体を含むグループの中から選択される。標準的には、リガンドは抗原又はハプテン；オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又はホルモン、代謝産物もしくは薬剤であり、その結合パートナーはそれぞれ、抗体又はその断片；相補オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド；又は受容体である。一般的に言って、リガンドは抗原（例えば分子量が約1000から約1000万の抗原性ポリペプチド又はタンパク質）又は、分子量が少なくとも約100以上で通常1500未満のハプテンであり；結合パートナーは相応する抗体又はFab又はFab'といったその断片である。

【0031】代表的なポリペプチド分析物は、アンギオテンシンI及びII、C-ペプチド、オキシトシン、バソプレシン、ニューロフィジン、ガストリン、セクレチン、ブラジキニン及びグルカゴンである。

【0032】代表的なタンパク質分析物としては、プロタミン、ムコタンパク、糖タンパク質、グロブリン、アルブミン、硬タンパク質、リンタンパク質、ヒストン、アポリポタンパク-A I及びアポリポタンパク-B 100といったアポリポタンパクを含むがそれに制限されるわけではないリポタンパク質、色素タンパク質及び核タ

ンパク質がある。特異的タンパク質の例としては、プレアルブミン、 α -リボタンパク質、ヒト血清アルブミン、 α -酸糖タンパク質、 α_1 -抗トリブシン、 α_1 -糖タンパク質、トランスコルチン、チロキシン結合グロブリン、ハプトグロビン、ヘモグロビン、ヒトヘモグロビンのベータサブユニット内の糖化ペプチド配列、ミオグロブリン、セルプラスミン、 α_2 -マクログロブリン、 β -リボタンパク質、エリトロポエチン、トランスフェリン、ヘモベキシン、フィブリノーゲン、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEといった免疫グロブリン及びその断片、例えばFc及びFab⁺、補体因子、プロラクチン、フィブリノーゲン及びトロニンなどの血液凝固因子、インシュリン、メラノトロピン、ソマトトロピン、チロトロピン、卵胞刺激ホルモン、ロイチン化ホルモン、ゴナドトロピン、絨毛性性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、胎盤性ラクトゲン、内因子、トランスコバラミン、血清酵素、例えばアルカリホスファターゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ、リパーゼ、フォスファターゼ、コリンエステラーゼ、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ及びウロペプシン、エンドルフィン、エンケファリン、プロタミン、組織抗原、細菌抗原、肝炎関連抗原（例えばB型肝炎表面抗原、B型肝炎コア抗原、及びB型肝炎e抗原）といったウィルス抗原及び腫瘍標識（例えば、ガン胎児性抗原、 α -胎児タンパク、前立腺酸性ホスファターゼ、前立腺特異性抗原、ニューロン特異的エノラーゼ、エストロゲンレセプター、ガン抗原125、ガン抗原19-9等）がある。

【0033】代表的なハプテン分析物としては、一般のクラスの薬剤、代謝産物、ホルモン、ビタミン、トキシン及び同様な有機化合物がある。ハプテンホルモンには、チロキシン及びトリヨードチロニンがある。ビタミンにはビタミンA、B、例えばチアミン、B₁₂、C、D、E及びK及び葉酸が含まれる。薬剤には、アミノグリコシド、例えばゲンタミシン、トブラマイシン、アミカシン、シソミシン、カナマイシン及びネチルミシン、ペニシリン、テトラサイクリン、テラマイシン、クロロマイセチン及びアクチノマイセチンなどの抗生物質；アデノシン二リン酸（ADP）、アデノシン三リン酸（ATP）、フラビンモノヌクレオチド（FMN）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）及びそのリン酸塩誘導体（NADP）などのヌクレオチド及びヌクレオチド、チミジン、グアノシン及びアデノシン；プロスタグランジン；エストロゲン例えばエストリオール及びエストラジオール、ステロゲン類、アンドロゲン類、ジゴキシン、ジギトキシゲニン、ジギトキシン、ジゴキシゲニン、12-0-アセテルジゴキシゲニン及び副腎皮質ステロイド等のステロイド；及び、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、エトスクシミド、カルバマゼピン、バルプロ酸塩、テオフィリン、カフェイ

ン、プロプラノロール、プロカイナミド、キニジン、アミトリプチリン、コルチゾール、デシプラミン、ジソピラミド、ドキセピン、ドクソルピシン、ノルトリプチリン、メトトレキサート、イミプラミン、リドカイン、プロカインアミド、N-アセチルプロカインアミド、アンフェタミン、カテコールアミン及び抗ヒスタミンといったその他のものが含まれる。トキシンには、アセチルT-2トキシン、アフラトキシン、コレラトキシン、シトリニン、サイトカラシン、ブドウ球菌エンテロトキシンB、HT-2トキシン等が含まれる。

【0034】液状試験混合物は、微粒子が、問題のリガンドの存在又は量の関数又は逆関数として凝集された状態になるように形成される。標準的には、これは、リガンド又はリガンドの結合類縁体又は結合パートナーで被覆された微粒子を使用することにより達成される。リガンドの結合類縁体は、試験が意味あるものとなるよう、十分に結合パートナーにより認識され結合されるいかなる物質であってもよい。このような結合類縁体は往々にして、リガンドの化学的誘導体又は断片又は前駆物質である。微粒子をリガンド、結合類縁体又は結合パートナーで被覆することには、疎水又はイオン結合等による吸着といった共有結合又は非共有化学結合の形成が関与しうる。微粒子を被覆するための特定の手段としては、基本的に試験上便利でかつ最適であるものが選択される。

【0035】微粒子は、凝集可能で従って、液状試験混合物の有効比誘電率を変化させることのできるさまざまな物質のいずれかから選択されうる。その非凝集状態において、微粒子は、分析的に見て液状試験混合物の比誘電率と有意に異なる有効比誘電率を示す。一般に、微粒子は約20nmから80nmまで、好ましくは約30nmから約50nmの平均直径を有する。微粒子は、ポリスチレン、ポリアミド又はその他のプラスチックのマイクロ溶球又はラテックス、セラミック粒子及び金属ゾルといった、好ましくは非磁性のさまざまな材料で構成されてよい。特に金属ゾルが好まれる。このような微粒子は、当該技術分野において充分に知られた方法により調製される。例えば、金ゾルは、標準的に水性金酸塩水溶液を酸化することによって調製される。標準的な調製は、100℃で30分間、0.2%（w/w）のクエン酸ナトリウムで0.1%（w/w）のテトロクロロ金酸塩溶液を酸化することを必然的に伴う。金ゾルは特に有利である。

【0036】本発明に従うと、微粒子の凝集は、マイクロ波分光学を用いて、約 5×10^8 ヘルツ（Hz）から約 3×10^{11} ヘルツの間に入るマイクロ波領域内の液状試験混合物の誘電特性の変化を測定することにより決定される。マイクロ波領域内のエネルギー吸収の変化を測定するいかなる手段でも、この目的のために利用することができる。共振回路の使用が特に好まれる。マイクロ波共振回路はさまざまな形のものであってよい。共振回路

の例としては、空洞又はその2重誘電共振器がある；一般に、その振動数における磁気蓄積エネルギーへの電気エネルギーの変換を可能にする全ての幾何構造を、励起電磁放射と共振状態にあるものと呼ぶことができる。スペクトルの可視範囲内での一般的な例としては、レーザー空洞がある。従って共振回路には、一般の電子プリント回路と同様に調製されるストリップラインなどの幾何構造も含まれる。マイクロ波範囲内では、セラミックスといった異なる基板材料が用いられるが、幾何パターン

のため写真及びエッチング技術又はシルクスクリーニングは、きわめて類似している。マイクロ波ストリップライン共振装置の使用が特に好ましい。

【0037】微粒子の凝集による液体試験媒質の誘電特性の変化は、伝搬定数の測定、反射分光学、及び時間領域分光学といったあらゆる周知の技術によって測定できる。

【0038】微粒子の凝集は、液体溶液又は懸濁液の中又は固体基板の表面で起こるように設計することができる。前者の場合、当該方法には好ましくは以下の工程が含まれる：

【0039】(a) リガンド又はその結合類縁体又は結合パートナーで被覆された微粒子及び前記試料を含む液状試験混合物を形成し、この微粒子が前記リガンド又はその結合類縁体で被覆されている場合には液状混合物を拡散可能な形のリガンドの結合パートナーをさらに含むように形成する工程；なお、被覆された微粒子の有効比誘電率は、試料中にリガンドが無い状態での試験混合物の比誘電率とは有意に異なるものである。及び

【0040】(b) 試験混合物内のリガンドの量又は存在の関数として、マイクロ波共振分光学の手段を用いて、マイクロ波領域内の試験混合物の比誘電率の変化を測定する工程。

【0041】このような液体凝集方法の一例としては、結合パートナーで被覆された微粒子の直接凝集による多価リガンドの測定がある。多価というのは1つ以上の結合パートナーと結合できる能力、従って多数の微粒子に結合した多数のリガンドを含むネットワークを形成できるようにする能力のことである。微粒子の凝集の程度はかくして、存在するリガンドの量の正関数である。

【0042】もう1つの例は、一価のリガンドの測定であり、この場合、拡散可能な多価形のリガンド又はその結合類縁体が結合パートナーで被覆された微粒子と共に付加される。このような多価の試薬は、リガンドが無い場合に微粒子を凝集するのに役立つ。従って、リガンドは微粒子に結合するために多価の試薬と競合することになるため、凝集の程度は存在するリガンドの量と反比例する。

【0043】液体凝集方法のもう1つの例は、(i) リガンド又はその結合類縁体で被覆された微粒子及び (i) リガンドのための結合パートナーの拡散可能な形、

を付加することによる、多価又は一価のリガンドの測定である。ここでも又、リガンドは拡散可能な結合パートナーとの結合のため、微粒子結合されたりリガンド又は類縁体と競合することになり、その結果、結果として得られる凝集の程度と試験混合物内のリガンドの量の間に反比例の関係が存在することになる。

【0044】当該方法は同様に、固体基板装置を用いて達成することもでき、その場合、方法には一般に以下の工程が含まれる：

【0045】(a) 前記リガンド又はその結合類縁体又は結合パートナーで被覆された微粒子及び前記試料を含む液体試験混合物を形成する工程。なおこの試験混合物は前記リガンドの結合パートナーが結合されている固体基板と接触状態にあり、被覆された微粒子は、試料中にリガンドが無い状態での試験混合物の比誘電率とは著しく異なる有効比誘電率を有する。及び

(b) 試験混合物内のリガンドの量又は存在の関数として、固体基板の表面でのマイクロ波領域内の試験混合物の比誘電率の変化を測定する工程。場合によっては、液体混合物を測定工程の前に固体基板との接触から除去することができ、さらに非特異的に結合した可能性のある微粒子を除去するためこのような表面をさらに場合によっては洗浄することもできる。

【0046】この方法の一態様においては、多価のリガンドは、リガンド上の互いに全く別の結合部位に通常導かれた、結合パートナーで両方共被覆された微粒子及び固体基板を用いて測定される。このようなサンドイッチタイプの様式の結果、存在するリガンドの量に正比例する基板表面と微粒子の結びつきが得られる。競合様式においては、微粒子はリガンド又はその結合類縁体で被覆される。かくして、試験混合物内のリガンドは基板表面上で結合パートナーに結合するため微粒子試薬と競争し、従って微粒子と表面の結びつきの程度は、存在するリガンドの量と反比例する。

【0047】

【実施例】以下に本発明について例示するが、本発明はこれらの例によって制限されるものではない。

【0048】実施例1

図面の図1及び図2を参照すると、比誘電率80のMurata-Erie (State College, PA, U.S.A.) から得た材料(11)上で共振回路(10)を作り、銀の接地面(12)上に配置した。形状は、指向性カプラーの形であり、すなわち、銀ペーストの伝送線(13)の隣に密に間隔どりされた0.002インチのU字形の銀ペーストセクション(14)がある。型枠としてポリエチレンビペットチップを用いてこのギャップの上にエポキシウェル(15)を作った。このウェルは90マイクロリットル(μL)の試料体積(16)を収納できたが、30 μL しか必要でなかった。エポキシ試料ウェルを伴うこの共振回路をマイクロストリップラインと同軸のタイプN

のアダプタ (17) 上にとりつけた。次に、ヒューレットパッカード 8753A ネットワーク解析器 (ヒューレットパッカード社、Palo Alto, CA, U.S.A.) でこのアセンブリを解析した。反射スペクトルを記録し、最低は 2.6 GHz (1 秒あたり 10° サイクル) で見い出されたが、これは試料を共振回路に提示した時点でその位置を変えた。

【0049】以下の手順により、絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) タンパク質で、金ゾルをコーティングした。激しく攪拌した 10 ml の金ゾル溶液に、100 μ l の hCG 水溶液 (合計タンパク質 250 μ g) を急速に添加した。10 分後、1% (w/w) のポリエチレングリコール (20,000 MW) (PEG) を 0.5 ml 加えた。さらに 10 分後、2 mM、pH 9 のホウ酸ナトリウム緩衝液中の 10% のウシ血清アルブミン (BSA) を 1 ml 付加した。懸濁液を 10,000 rpm で遠心分離し、上澄みを除去した。ホウ酸塩緩衝液中の 1% の BSA 及び 0.05% の PEG で 6 回の洗浄を行なった。次に、タンパク質で被覆された金属ゾルを水で望ましい濃度まで戻した。粒子の直径は Coulter 光散乱計器で測定したところ 40 ナノメートル (nm) であった。懸濁液は 1% (w/v) のウシ血清アルブミンとポリエチレングリコール (MW 6,000, 1.5% w/v) を伴うリン酸塩緩衝液であった。金ゾル溶液に 1/100 の希釈度で hCG ポリクローン性抗血清が加えられると、凝集反応が起こり、これを 0.08 nm における吸光度と時間の関係を測定することによって監視した (図 3)。同じシステムをマイクロ波共振回路の試料ウェル内にも入れ、共振の振動数シフトを追跡した (図 4)。抗体を含まない対照溶液では振動数シフトも吸収度の変化も全く生じなかった。

【0050】実施例 2

異なる幾何形状のもう 1 つの共振回路を作った。これは、3 つのセクションすなわち、コンデンサーインダクターコンデンサから成り、全て Murata-Erie からの誘電性材料 ($\epsilon' = 80$) 上にストリップライン構成で作られていた。合計体積 10 μ L の液体試料を収容するため、第 2 のコンデンサ上にエポキシウェルを作った。試料が存在する中で 465 MHz (1 秒あたり 10° サイクル) の共振振動数を測定するため、ネットワーク解析器 (HP 8753A) を用いた例 1 で引用したものと同一凝集反応をこの共振回路で用いた。中心振動数を反応中監視した (図 5)。対照溶液は、反対方向に小規模のドリフトを生じた。実験を反復したところ、類似の結果がみられた。

【0051】実施例 3

感度を改善するため、共振回路が能動発振器の振動数の責任を負う回路要素を形成しているような新しい回路を設計した。このとき、エネルギーの最大出力は、振動の振動数で起こり、その精確な測定は、受動的吸収

タイプの測定ほどノイズによる影響を受けない。選択された回路は、その有能指数の高さ (Q 又はスペクトル出力の鮮鋭度) のため、シリンダの形をした誘電共振器であった (マイクロ波空洞の 2 重性)。試料は、凝集のモデルシステム、つまり金ゾル粒子の化学的に誘発された凝集であった。クエン酸塩の付加によって、直径 40 nm の粒子の金ゾルを安定化した。凝集はピリジンの付加により開始させた (最終濃度 10⁻⁵ M)。発振器の振動数の変化を再度監視した (図 6)。

【0052】実施例 4

実施例 3 の誘電共振器を、試料提示のためにより便利な形状に整形することが可能である。材料は、試料がそれによって吸収されるほどまで多孔質にすることが可能である。回路の共振は、振動回路を形成する伝送線の選択された一点に近く置かれた、多孔質プラグの液相内で進行する反応のため、再びシフトする。

【0053】本発明について以上に特定の記述し、例示してきた。当然のことながら、本発明に対し、その精神及び範囲から逸脱することなくその他の数多くの変更及び修正を加えることが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明において有効な標準的共振回路の上面図である。(詳細が実施例 1 に示されており、図面中の寸法は実物大の約 4 倍である)。

【図 2】図 1 に示されている回路を 2-2 で切断した断面図である。

【図 3】時間の経過につれて吸光度に対する微粒子の凝集の効果を示すグラフである。微粒子は、絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) で被覆された金ゾルであり、凝集は、hCG に対する抗体の付加によって開始された。

【図 4】2 つの異なるマイクロ波共振回路における、共振振動数に対する微粒子の凝集の効果を示すグラフである。微粒子及び凝集イニシエータ (初発因子) は、図 3 に結果が記されている実験の場合と同じであった。

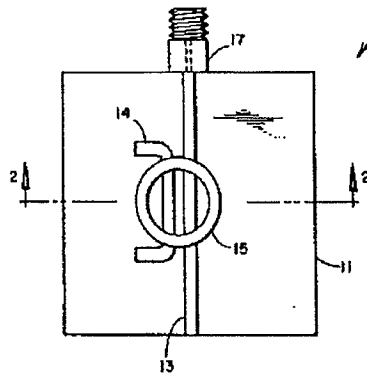
【図 5】2 つの異なるマイクロ波共振回路における、共振振動数に対する微粒子の凝集の効果を示すグラフである。微粒子及び凝集イニシエータ (初発因子) は、図 3 に結果が記されている実験の場合と同じであった。

【図 6】能動発振器の振動の振動数を制御する、共振回路に対する微粒子凝集の効果を示すグラフである。

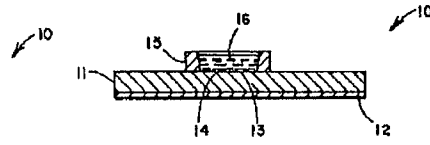
【符号の説明】

- 10 共振回路
- 11 材料
- 12 接地面
- 13 伝送線
- 14 銀ペーストセクション
- 15 エポキシウェル
- 16 試料体積
- 17 アダプタ

【図1】



【図2】

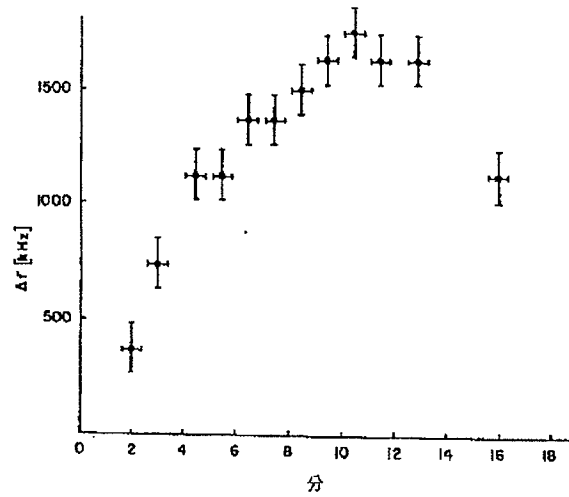
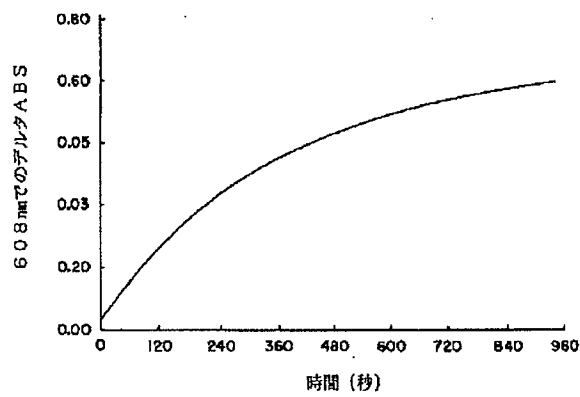


【図4】

2.627663GHzからの振動数シフト
スパン200MHz 12.0kHz分解能
〜20db分

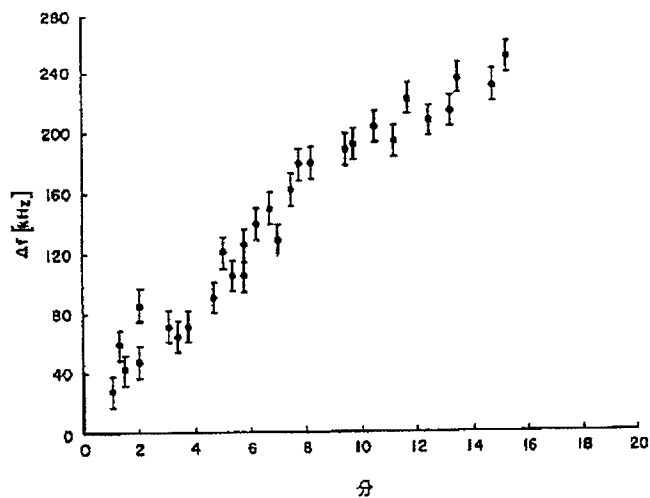
【図3】

金ゾル凝集
hCG/Pab

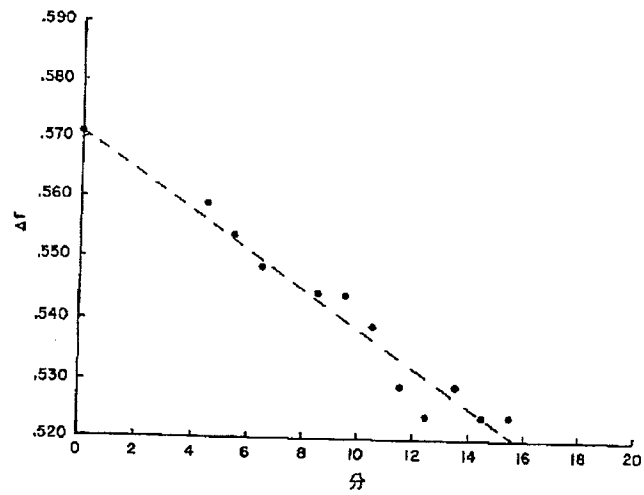


【図5】

中心振動数484.997MHz
5kHz分解能50MHzスパン



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 ポール・オー・ボゲルハット
アメリカ合衆国、インディアナ州、46544、
ミシャワカ、ドラグーン・トレイル
12497